

<p>88-327830/46      804 D16 J04 S03      IATR 30.03.87  IATRON LABORATORIES      *J6 3243-101-A  30.03.87-JP-074550 (11.10.88) C08b-37/16 G01n-33/52  Cyclodextrin deriv. covalently-bound with basic functional gp. - promotes colouring of nitrophenol deriv. in visible light region and is used in enzyme activity determ.  C88-144949</p>	<p>B(4-B2C, 4-C2B1, 11-C7B1, 12-K4A) D(5-A2, 6-H2) J(4-B1B)</p>
<p>A cyclodextrin deriv. covalent-bound with basic functional gp., is claimed.  Basic functional gp. has structured formula (I), where R1 and R2 = H or 1-3C lower alkyl group, n = 1-3. In the colouring method using the dextrin deriv. bound with basic functional gp., nitrophenol deriv. is included in the cyclodextrin deriv. and colouring is caused by adding the cyclodextrin deriv. in a reaction system forming nitrophenol deriv.. Colouring of nitrophenol deriv. is carried out in neutral to weakly acidic condition. Gp. of formula (I) is e.g. diethylaminoethyl gp., dimethylaminopropyl gp., aminoethyl gp., etc. The cyclodextrin deriv. bound with basic functional gp. has much higher solubility to water than cyclodextrin, and the inclusion cpd. of nitrophenol deriv. with the cyclodextrin deriv. bound with basic functional gp. can be easily dissolved in water, consequently high colouring effect to nitrophenol deriv. can be obtd. in neutral or weak acidic state.  USE/ADVANTAGE - The cyclodextrin deriv. bound with basic functional gp. promotes colouring of nitrophenol deriv. in visible</p>	<p>light region and is useful for various methods of determining activity of enzyme by using synthetic substrate bound with nitrophenol deriv.. (6pp Dwg.No.0/1)</p> <div style="text-align: center;"> <math display="block">\begin{array}{c} R_1 \\ \diagdown \\ N-CH_2 \xrightarrow{n} \\ \diagup \\ R_2 \end{array} \quad (I)</math> </div>

⑨ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-243101

⑮ Int. Cl.

C 08 B 37/16  
G 01 N 33/52

識別記号 庁内整理番号  
6779-4C  
A-8305-2G

⑬ 公開 昭和63年(1988)10月11日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑭ 発明の名称 シクロデキストリン誘導体及び発色方法

⑯ 特 願 昭62-74550

⑰ 出 願 昭62(1987)3月30日

⑱ 発 明 者	八 木	達 彦	静岡県静岡市北1664番地の33
⑱ 発 明 者	久 田	隆 基	静岡県静岡市下島615番地の72
⑱ 発 明 者	尾 形	真 理	静岡県静岡市大谷836 静大宿舍336
⑱ 発 明 者	柴 田	秀 人	千葉県四街道市千代田1-29-15
⑱ 発 明 者	嶋 本	三 利	千葉県八千代市大和田新田469-428
⑱ 発 明 者	大 沢	力	千葉県船橋市習志野台1-8-20 コーポすばる202
⑲ 出 願 人	株式会社	ヤトロ	東京都千代田区東神田1丁目11番4号
⑳ 代 理 人	弁理士	山下 稔平	

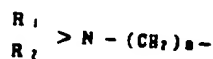
明 細 書

1. 発明の名称

シクロデキストリン誘導体及び発色方法

2. 特許請求の範囲

- (1) 塩基性官能基を共有結合させたシクロデキストリン誘導体。
- (2) 塩基性官能基が下記式で表されるものである特許請求の範囲第1項記載の化合物。



(式中、 $R_1$ 、 $R_2$  はそれぞれ炭素数1~3個の低級アルキル基もしくは、水素を示し、 $n$  は1~3の整数を表す。)

(3) 塩基性官能基を共有結合させたシクロデキストリン誘導体を用いて、ニトロフェノール誘導体を包埋することを特徴とする発色方法。

(4) ニトロフェノール誘導体を生成する反応系に、上記誘導体を共有させ発色を行わせることの特許請求の範囲第3項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は塩基性官能基で修飾されたシクロデキストリンに関するもので、合成薬質を用いた測定法等に應用され、臨床化学検査等の分野において効果的に用いられる。更に本発明はニトロフェノール類を中性ないし弱酸性条件下で発色させるための試薬及び方法に関するものである。

〔従来の技術〕

ニトロフェノール類の1種である4-ニトロフェノール(パラニトロフェノールともいう)は4-ニトロフェノール基をもつ各種合成薬質が特定の酵素作用により分解されるときに生成する物質で、この物質の増加を随時的に定量することにより当該酵素の活性を容易に測定することができる。例えば、フォスファターゼの活性を測定するためには4-ニトロフェノールリン酸を基質として遊離して生じる4-ニトロフェノールを定量する。フォスフォジエステラーゼの活性測定にはビス(4-ニトロフェニル)リン酸を基質として両

様に測定する。 $\beta$ -N-アセチルヘキサミニダーゼと $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの活性測定では、合成基質として4-ニトロフェニルN-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニドが利用される。その他、各種のグリコシダーゼ(グリコシド結合の加水分解を触媒する酵素)、ホスホリラーゼC、トリプシンやキモトリプシンなどのセリンプロテアーゼ、D-グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼなどに対し、4-ニトロフェニル基をもつ合成基質が開発され、臨床検査をはじめとするさまざまな分野で実用に使われている。

〔発明が解決しようとする問題点〕

以上の例で示した各種酵素の活性測定が可能となる原理は、例えば4-ニトロフェニル基をもつ合成基質の場合、その合成基質と遊離して生じる4-ニトロフェノールの間で吸光スペクトルに差があるという事実に基づいている。すなわち、4-ニトロフェニル基をもつ合成基質は広いpH領域において紫外部(波長300~320nm)

に強い吸光ピークをもち可視部(波長400nm以上)にはほとんど吸光を示さないが、4-ニトロフェノールはアルカリ性pH領域において遊離し、400nm付近を中心とする強い吸光ピークをもつ4-ニトロフェノレート・アニオンを生じる。したがって、測定しようとする酵素の活性をアルカリ性pH領域で測定できれば、酵素反応の進行にともなう可視部の免色を400nmの吸光度増加として連続モニターでき、正確なレートアッセイが可能となる。しかし、測定しようとする酵素の最適pHが中性ないし弱酸性の領域にあれば、4-ニトロフェノールの吸光スペクトルは4-ニトロフェニル基をもつ合成基質の吸光スペクトルとほとんどオーバーラップしてしまい、免色が微弱で、反応を経時的に連続モニターすることが著しく不都合となる。そこで、現行の測定法では、酵素反応をスタートさせてから一定時間後は、アルカリを添加して反応を停止させると同時に生成した4-ニトロフェノールを免色させ、その400nm付近の吸光度を測定するという方法が

多く採用されている。すなわち、現行測定法では酵素活性測定法としてより正確で簡便な形式といわれる理想的なレートアッセイが困難だけでなく、アルカリ添加という余分な操作を必要とする。

中性ないし弱酸性の領域に最適pHをもつ酵素には、例えば酸性フォスファターゼ、 $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼなど臨床化学的に重要な酵素が含まれている。これら諸酵素の反応を経時的に連続モニターするための有用な手段を得ることができれば、測定操作を簡素化し、測定時間を短縮できるだけでなく、測定精度をも高め、各種疾患の早期発見や診断に正確な情報を提供できる。

従って、4-ニトロフェノール及びその他のニトロフェノール類の中性ないし弱酸性のpH領域での効果的な免色促進作用を有す試薬の開発は、臨床化学検査分野における実用面に重要な課題となっている。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明は、塩基性官能基を共有結合させたシクロデキストリン誘導体である。

更に本発明は、塩基性官能基を共有結合させたシクロデキストリン誘導体を用いて、ニトロフェノール誘導体を包接することを特徴とする免色方法である。

以下、本発明を詳細に説明する。

4-ニトロフェノールをはじめとする芳香族化合物は、親水の性質をもつフェニル基がシクロデキストリンに取り込まれて包接化合物を形成することが知られている。これにより芳香族のイオン状態に微妙な変化が起されれば電離の促進が期待される。そこで、4-ニトロフェノール等にローシクロデキストリンまたは $\beta$ -シクロデキストリンを添加すると電離が進行し、400nm付近の吸光度の増大がみられるが、その効果は中性から特に弱酸性領域ではなお満足できるものではなくそれ自体の溶解性の低さも合わせ、実用化には多くの問題を含んでいる。

本発明者等は、包接検討の結果、シクロデキス

トリンに  
り、フェ  
いかど  
ル類の  
こで増  
導体をイ  
ニトロ  
ル類の  
ろ、固  
達成し  
本発

性官能  
び、フ  
結合体

C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

NaOH

C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

同様

毒性の  
素反応  
ば向  
ーゼ  
エニ  
ル)  
場合  
溶解  
溶解  
い。  
はた  
能に  
でこ  
るも  
と  
作  
受  
エ  
5  
チ

## 43101 (2)

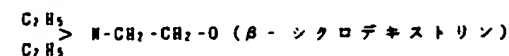
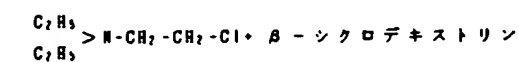
長 400nm 以下で電離し、ピークをもつ活性をアルカ反応の進行に吸光度増加とトアッセイがする酵素の活性領域にあるベクトルは4の吸光スペクトルを有し、発色剤として用いる測定法で一定時間後とすると同時に発色させ、その方法が

結合させたシクロデキストリンと結合させた4-ニトロフェニルを特徴とする発色剤

とする芳香族化レ基がシクロデキストリンを形成する芳香族のイオンの促進が期待される等によりシクロデキストリン 0.1% 付近の吸光は中性から特に顕著な増大を示す。この増大は多くのシクロデキス

トリンに塩基性官能基を共有結合させることにより、フェノール性水酸基の電離の促進が起らないかどうか、またそれにより4-ニトロフェノール類の発色促進が起らないかどうかを試みてそこで塩基性基を結合させたシクロデキストリン誘導体を合成し、中性ないし弱酸性pH領域で、4-ニトロフェノールおよびその他のニトロフェノール類の吸光スペクトルに対する効果を調べたところ、顕著な発色効果をもつことが判明し本発明を達成した。

本発明を更に詳述すると本発明のために、塩基性官能基としてマゼチルアミノエチル基を選び、下記の原理により、そのシクロデキストリン結合体を合成した。



同様にしてα-シクロデキストリンのジエチル

性のニトロフェノール誘導体が発色剤として酵素反応の経過観察のために結合されている。例えば前記のN-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ測定のための合成基質である、4-ニトロフェニル（あるいは2-クロロ-4-ニトロフェニル）-N-アセチル-β-D-グルコサミニドの場合、β-シクロデキストリンの助けで必要量の酵素が試みられるが、シクロデキストリン自身の溶解性の悪さのためその目的を十分に果たし得ない。それに比し、本発明によるDEα、DEβ等はたやすく水に溶解させることができ、その包括性により上記基質等を十分に必要量溶かし得るのでこの面においても本発明に実用的価値を付加するものである。

更に本発明の本質である中性ないしは弱酸性条件下でのニトロフェノール誘導体に対する発色効果を種々の誘導体を用いて調べた。4-ニトロフェノール、2-クロロ-4-ニトロフェノール、5-ニトロサリチル酸、5-ニトロサリチル酸メチル、2,4-ジニトロフェノールなどについて

## 特開昭63-243101 (3)

アミノエチル結合体が得られる。またジエチルアミノエチル基以外にジメチルアミノエチル、ジメチルアミノプロピル、アミノエチル基等の結合体も得ることができる。このように塩基性官能基で修飾されたシクロデキストリン、例えばジエチルアミノエチル化α-シクロデキストリン（以下DEαと略す。）およびジエチルアミノエチル化β-シクロデキストリン（以下DEβと略す。）は意外にも、通常のシクロデキストリンに比べはるかに水によく溶け実用に供し易いものであった。現在、特に安価で一般に用いられているβ-シクロデキストリンは比較的に水に難溶性でこの性質が臨床化学検査等における実用上の弱点を決めているものである。

すなわち、難溶性の目的物質をβ-シクロデキストリンの包接により溶解せしめる時シクロデキストリン自身の溶解性によりその溶解度が限定されてしまうのである。具体的には特定酵素の活性を測定するためによく使用される合成基質の溶解の場合などである。加水分解酵素の場合は多く難

である。強くべきことにこれらの中で最も中性ないしは特に弱酸性下で電離が微弱な、すなわちpH 5.0 付近においては、400nm 付近での電離性の可視発色ピークが認められない4-ニトロフェノールでさえ、DEαあるいはDEβの1%以下の通常濃度の存在下でその400nm 付近に大きな新しい電離性の発色ピークを出現させ、DEα、DEβの作用とその効果が顕著であることが示された。通常のシクロデキストリンではこれ程の効果は認められない。またDEα、DEβでは水への溶解性がよいため使用量を増やして効果的な増強できる。また他のニトロフェノールについても1%以下の通常濃度で、数倍に及ぶ可視発色効果が示された。

特に2-クロロ-4-ニトロフェノールは中性ないし弱酸性下で4-ニトロフェノールに比べ、比較的発色がなされ易いものとして、最近それを結合させた特定酵素のための合成基質が供されているが、例えばpH 5.0 以下で酵素反応を行う前記のN-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ等

については、酵素反応の結果そのpHで生成する2-クロロ-4-ニトロフェノールの400nm付近における電離発色は、なお、全く不十分で、その生成量を連続モニターできるほどの感度と精度をもたない。しかるに、ここへのDE $\alpha$ 、あるいはDE $\beta$ の添加は生成する2-クロロ-4-ニトロフェノールの吸収スペクトルをほぼ完全電離に近いかたちに出現せしめ発色させるので、ほぼ理想的な状態での当酵素の連続モニター測定が行える。

前記のとおり、DE $\alpha$ 、DE $\beta$ ないしは充分水に溶け易く、当合成基質の必要量を反応液に溶解できることと合わせ実用面に著しい効果を供するものである。

以上の効果は、同様に、中性付近で反応を行う $\alpha$ -アミラーゼのための合成基質である、4-ニトロフェニル-マルトヘブタオシド、あるいは2-クロロ-4-ニトロフェニル-マルトペンタオシド等を用いて生成するニトロフェニル誘導体を400nm付近で連続モニターする $\alpha$ -アミラーゼ

1.5gを含む4mlの水溶液を調下していくと透明な液が得られる。さらに攪拌を続けながら、ジエチルアミノエチルクロリド塩酸塩1.4gを含む2mlの水溶液を調下し、30~40℃で数時間攪拌を続けると反応は完全に終結する。この反応混合液より、セファデックスG-25カラムクロマトグラフィーにより低分子物質を除去することにより1.8gのDE $\alpha$ が得られる。得られたDE $\alpha$ はジエチルアミノエチル基を1個ないし2個共有結合していることが中和滴定およびプロトン核磁気共鳴より判明した。

2. 2-(N,N-ジアルキルアミノエチル)- $\beta$ -シクロデキストリン(以下、DE $\beta$ と略記):  
上記合成1において $\alpha$ -シクロデキストリンのかわりに $\beta$ -シクロデキストリンを用いることにより、ほぼ同収率でDE $\beta$ を合成することができる。

#### 実施例2

DE $\alpha$ の4-ニトロフェノールに対する可視部発色効果と酵素反応への応用。

の測定の場合、あるいは、よりpHの低い領域で酵素反応を行わせる酸性フォスファターゼ測定のためのニトロフェノール誘導体を結合させた合成基質を使用する場合などにおいても、通常のシクロデキストリンに比し、はるかに効果的に使用される。

以上DE $\alpha$ 、DE $\beta$ について本発明の効果を述べたが他の塩基性官能基を修飾したシクロデキストリン及び他の酵素反応のためニトロフェノール誘導体を結合した他の合成基質を使用する場合においても本発明の本質は、同様である。

#### 【実施例】

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

#### 実施例1

##### (発色試薬の合成法)

1. 2-(N,N-ジアルキルアミノエチル)- $\alpha$ -シクロデキストリン(以下、DE $\alpha$ と略記):  
 $\alpha$ -シクロデキストリン2.4gを4mlの蒸留水に懸濁させ、攪拌しながら水酸化ナトリウム

第1図はpH 5.0における4-ニトロフェノールの吸収スペクトルと、発色試薬としてDE $\alpha$ を濃度1%に添加した場合の吸収スペクトルを比較したものである。この図より明らかなように4-ニトロフェノールは400nm付近においてほとんど吸光度をもたないが、DE $\alpha$ を含む溶液中で顕著な発色促進効果が示され400nmにおける吸光度は、4-ニトロフェノールの紫外部吸光度の30%以上に達し、十分に測定可能となる。一方、4-ニトロフェニル合成基質の1つである4-ニトロフェニル-N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニドの吸収スペクトルは、pH5.0における4-ニトロフェニルのスペクトルよりわずかに低波長にシフトしている以外はほとんど同じで、これにDE $\alpha$ を濃度1%に添加しても、吸収ピークの微少な長波長シフトが観察されるだけで400nm付近における吸光度は全く影響を受けない。したがって、DE $\alpha$ を含むこの反応液中で4-ニトロフェニル-N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニドを基質として、N-アセチル- $\beta$ -D-グル

コサミ  
エノー  
ニター  
ができ  
極大を  
する分  
する性  
度変化  
測定値  
である  
可視部  
か観察  
pH領域  
実施例  
DE  
発色効  
実効  
いるこ  
得るこ  
実施例

の要  
実施  
D  
に対  
実  
いろ  
DE  
どう  
DE  
(i)  
%を  
い  
は、  
ない  
立  
増  
(i  
の  
い  
の



4. 図面の簡単な説明

第1図は4-ニトロフェノールの吸光スペクトルのDE $\alpha$ による影響を示すグラフ図である。

イ…pH5.0 20 $\mu$ 酢酸緩衝液中

ロ…DE $\alpha$ 1%を含むpH5.0 20 $\mu$ 酢酸緩衝液中

第1図

